

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO PRIMARIO DE *Brucella melitensis* A PARTIR DE LECHE DE CABRAS**

*EVALUATION OF METHODS FOR THE PRIMARY ISOLATION OF *Brucella melitensis* IN GOAT MILK*

**D.I. Martínez Herrera\*, María A. Abeledo\*\*, A. Lara Gutiérrez\*, A. Peniche Cardeña\*, M.L. Robledo Salinas\*, E. Pulido Camarillo\*, T.J. Rosas Sastre\*\*\*, R. Flores Castro\*\*\*\***

*\*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver. México. \*\*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. \*\*\*Facultad de Nutrición, Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver. México. \*\*\*\*CENID Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México, D.F., México*

**RESUMEN**

Con el propósito de evaluar varios métodos para el aislamiento primario de *Brucella melitensis* a partir de leche procedente de rebaños caprinos infectados se seleccionaron de forma aleatoria 45 cabras bajo los siguientes criterios: 30 vacunadas previamente, con la cepa Rev-1 de *Brucella melitensis*; y 15 hembras nunca vacunadas. El tamaño de muestra se basó en un modelo probabilístico con población desconocida y con prevalencia conocida de 35% ( $n = 1 - p / p v$ ); donde,  $n$  = tamaño de muestra,  $p$  = prevalencia y  $v$  = coeficiente de variación (0.05). Todas las cabras seleccionadas se muestrearon por tres ocasiones a intervalos de 30 días entre uno y otro muestreo. Las muestras de leche fueron tomadas en forma aséptica de cada mitad de la ubre, en tubos estériles de cierre hermético y se refrigeraron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio, dentro de las siguientes 24 horas. Las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 10,000 X g a 4°C. y para la siembra, se utilizaron los medios de cultivo de Farrell y de agar de soya tripticaseína (TSA) enriquecidos con suero fresco de bovino. De las muestras de leche centrifugadas, se sembraron por duplicado en cada medio, porciones de grasa y sedimento de acuerdo con técnicas establecidas en la NOM - 041 - ZOO - 1995. Los resultados obtenidos, se evaluaron a través del análisis de datos categóricos ( $\chi^2$ ). Una mitad de cada uno de los medios empleados, se incubó bajo presión de bióxido de carbono del 5 al 10% y la otra, en aerobiosis. Se recuperó *B. melitensis* biovar-1 en el 76% de 135 muestras procesadas; y la mayor cantidad de cepas de campo se aislaron a través del medio Farrell ( $p < 0.05$ ); de la grasa, el 57% y del sedimento, el 67%. Además, el mejor desarrollo de las bacterias ( $p < 0.05$ ) en este medio se observó en la incubación bajo atmósfera de aerobiosis. Se concluye que el medio de Farrell fue más eficaz que el de TSA para ese fin, tanto a partir de la grasa de la leche como del sedimento; asimismo, la incubación de las muestras en atmósfera de aerobiosis tuvo un mejor y más exitoso desarrollo de las bacterias.

**ABSTRACT**

In order to evaluate different methods for the primary isolation of *Brucella melitensis* in goat milk from infected herds, Ver., 45 female adult goats were randomly selected through the following criteria: 30 previously vaccinated with *Brucella melitensis* Rev-1 strain, and 15 never vaccinated. Sample size was estimated by a probabilistic model, with unknown population and 35% known prevalence rate ( $n = 1 - p / pv$ ); where n corresponds to sample size, p for prevalence rate and v variation coefficient (0.05). All goats selected were sampled three times within a 30 day interval to guarantee *Brucella* spp. milk shedding. Milk samples were aseptically collected into sterile glass tubes from half udder and were refrigerated at 4°C until they were laboratory processed into the next 24 hours. Milk samples were 10,000 X g centrifuged during 20 minutes, in a refrigerated centrifuge at 4°C. Farrell and Trypticase Soy Agar (TSA) media, were the isolation culture media selected and both were enriched with bovine fresh serum during their formulation. Both isolation culture media selected were inoculated by duplicate with fat and sediment from centrifuged milk as it is established in the Mexican regulations. The results obtained were statistically evaluated by Chi square ( $\chi^2$ ). A half of both inoculated isolation culture media was incubated under 5 to 10% carbonic dioxide atmosphere and the other half in aerobic one. From 76% of 135 milk samples obtained, only *Brucella melitensis* biovar - 1 was isolated using both culture media; however, the majority of isolated field strains were recovered from Farrell culture medium ( $p < 0.05$ ); from milk fat 57% of isolated strains and from milk sediment 67%. Also, the best *Brucella melitensis* biovar - 1 development ( $p < 0.05$ ) from Farrell culture medium was observed by aerobic atmosphere incubation. It is conclusive that Farrell culture medium is more effective than TSA medium for that purpose, both from the fat and sediment of milk, likewise incubation of the samples in aerobic atmosphere was better and there was more successful development of bacteria.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los casos humanos de brucelosis, se encuentran en aquellos países donde *B. melitensis* es el agente causal de la infección en caprinos y ovinos (1-3). Así, en América Latina son Argentina, México y Perú donde se presentan el mayor número de estos lo que se debe a las condiciones en las que los caprinos son explotados, ya que la leche producida, pocas veces se pasteuriza (4). Así también, debe considerarse que en México, más del 60% de los casos, se presentan en mujeres que poco tienen que ver con la producción de caprinos, ya que se desempeñan como amas de casa o estudiantes, entre 14 y 45 años; sin embargo, los datos epidemiológicos conducen a identificar que la fuente de infección, corresponde a contaminaciones alimenticias con lácteos sin pasteurizar y elaborados con leche de cabra (4).

La Norma Oficial Mexicana (5) que rige la Campaña Nacional contra la brucelosis en los Animales y cuyo objetivo principal es el establecimiento de zonas libres, tiene como fundamento evitar la propagación de la enfermedad y su eliminación dentro del territorio mexicano; asimismo, señala que el diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza a través del aislamiento e identificación bacteriológica. Sin embargo, la sensibilidad del método bacteriológico depende de la viabilidad y el número de microorganismos presentes en la muestra y de la naturaleza de la misma, la cual se contamina con frecuencia con otras bacterias (6).

La utilización de muestras en forma adecuada y la disponibilidad de medios selectivos permiten realizar el diagnóstico bacteriológico con eficacia (7). Las muestras que se recomiendan para el cultivo de *Brucella* en cualquier especie

son las secreciones vaginales tras el parto o aborto, placenta o fetos abortados (hígado, bazo, pulmón, y contenido gástrico), semen y la leche. Esta última, resulta muy recomendable ya que más del 80% de los animales enfermos excretan *Brucella* por la leche (8) y constituye una vía importante de transmisión al hombre (9); no obstante no existe suficiente información disponible relacionada con el diagnóstico bacteriológico en cabras a partir de este material.

Existe una amplia variedad de medios selectivos que son utilizados para este propósito, siendo los más comunes el medio de Farrell, Agar de Soya Tripticaseína (TSA) y Thayer-Martin (10).

El medio selectivo de Farrell es ampliamente empleado ya que tiene un poder de selección y capacidad de asegurar el crecimiento de las bacterias, y es transparente lo que facilita observar la morfología colonial; sin embargo, debido a la concentración de bacitracina una proporción de cepas *B. melitensis* puede ser inhibida, por lo que algunos autores recomiendan el medio de Thayer-Martin modificado, que permite aumentar la sensibilidad del cultivo, pero con una menor selectividad y por tanto, se contamina con más facilidad que el de Farrell; además, no es transparente lo que dificulta la visualización de la morfología colonial por medio de iluminación oblicua (11). Por otra parte el medio TSA es un medio general, que permite el crecimiento de cualquier tipo de bacteria pero se contamina con mucha facilidad (12).

Este trabajo tiene como objetivo realizar una evaluación comparativa entre varios métodos de aislamiento de *Brucella melitensis* a partir de leche de cabras.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El trabajo se realizó en Tenextepec, Municipio de Perote, Veracruz, México, donde se seleccionaron al azar cabras en producción láctea, que se dividieron en 2 grupos, uno que había sido vacunado con la cepa Rev - 1 de *Brucella melitensis* y un segundo no vacunado.

El tamaño de la muestra, se calculó a través de la ecuación  $n = 1 - P / PV$ ; donde, n representa el tamaño de la muestra; P, la prevalencia estimada de la enfermedad en la zona (35%) y V (5%) la máxima variación permitida (13).

Para tomar la muestra de las 45 cabras, las glándulas mamarias se lavaron con agua y jabón y la antisepsia se hizo con alcohol al 70%; posterior a ello, la leche fue colectada en tubos estériles, transportada y mantenida en refrigeración a 4°C por espacio de 24 horas, con el objeto de lograr una correcta separación del anillo de crema.

Todas las cabras, se evaluaron a través de exámenes bacteriológicos en muestras de leche que se colectaron cada 30 días por tres ocasiones, con el fin de determinar si en este periodo alguna de ellas eliminaba *B. melitensis* u otras especies del género *Brucella* a través de la leche. Las pruebas se realizaron en las instalaciones del laboratorio de la Unidad, Servicios y Estudios en Salud de la Universidad Veracruzana, Región Veracruz.

El diagnóstico bacteriológico se realizó en muestras de leche de acuerdo con los procedimientos descritos por Alton *et al.* (14), mediante la centrifugación por 20 minutos a 10,000 X g a 4°C, con el objeto de separar la grasa y el sedimento de la fase líquida y precipitar las bacterias libres.

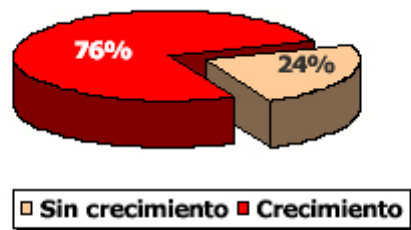
Se emplearon los medios de Farrell y TSA enriquecidos con suero bovino, los que se inocularon por duplicado con grasa y sedimento. Una mitad se incubó en

atmósfera de aerobiosis y la otra, bajo presión del 5 a 10% de dióxido de carbono; en ambos casos, por espacio de 2 semanas con revisiones cada 96 horas. Del mismo modo, las colonias aisladas se identificaron como lo indica Alton *et al.* (14); es decir, por pruebas bioquímicas de identificación para especie, biovariedad y específicas para cepas vacunales de referencia.

Los resultados obtenidos se evaluaron por análisis de datos categóricos ( $X^2$ ) con la finalidad de conocer si existen diferencias en los aislamientos entre ambos medios de cultivo (15, 16,17).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se aisló e identificó *B. melitensis* biovar 1, del 76% de las 135 muestras colectadas, del 24% restante, no hubo desarrollo de otras especies del genero *Brucella* o de la vacuna que se utilizó en las cabras como puede apreciarse en la Figura 1.

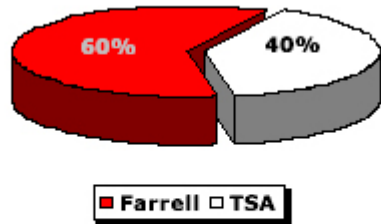


**FIGURA 1.** Aislamiento de *B. melitensis* biovar - 1 a partir de grasa y sedimento. / *B. melitensis* biovar - 1 isolation from fat and sediment.

A pesar de los novedosos métodos desarrollados (19, 20), el diagnóstico bacteriológico de la brucelosis es la forma incontrovertible de demostrar la infección en un rebaño afectado; por tanto, la correcta toma de muestras y la utilización de medios de cultivos selectivos adecuados, constituyen la parte más esencial del proceso. Los medios más eficaces para ese fin, son el de Farrell, TSA, y Thayer - Martin modificado, ya que tienen una alta especificidad para asegurar el crecimiento de las cepas de *Brucella* (7), si se les compara con otros como el agar *Brucella*, agar papa, entre otros (11,12). Esta situación quedó demostrada con claridad al lograr el aislamiento de *B. melitensis* biovar 1, como se puede ver en la Fig. 1.

Así también, en la década de los 60 la Organización Mundial de Salud (OMS), indicó que la cepa Rev - 1 de *B. melitensis*, es segura si se aplica de manera correcta y se siguen las recomendaciones de dosis y edad apropiadas para su aplicación (3,14), por lo que las acciones de vacunación que se realizaron en la región de Perote fueron adecuadas en cuanto a seguridad de cepa vacunal se refiere, pues ninguno de los aislamientos obtenidos, corresponde con la cepa utilizada para la vacunación de las cabras que se seleccionaron, a pesar de que pertenece al mismo biovar encontrado.

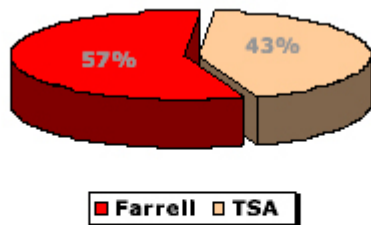
Sin considerar la atmósfera en que se encontraban y si el aislamiento fue a partir de grasa o sedimento, *B. melitensis* biovar - 1 se recuperó en el 60% de las muestras en medio de Farrell y sólo el 40%, en el TSA como se aprecia en la Figura 2.



**FIGURA 2.** Aislamiento de *B. melitensis* biovar 1 en medios de cultivos de Farrell y TSA./ *B. melitensis* biovar 1 isolation from Farrell and TSA culture media.

Los medios de cultivos de Farrell y TSA deben enriquecerse con suero bovino para el aislamiento de *Brucella* spp. El medio de Farrell es transparente, lo que facilita la visualización de la morfología colonial; sin embargo debido a las concentraciones de bacitracina y ácido nalidíxico que en él se encuentran, se inhibe el crecimiento de algunas cepas de *B. melitensis* y *B. abortus*, según lo señalan algunos autores (10,11), por lo que recomiendan sembrar las muestras además en otros medios como el de Thayer - Martin modificado o el de TSA, los cuales, son de menor selectividad y pueden ser menos tóxicos para algunas cepas de *Brucella* spp, pero se contaminan con más facilidad (7,11,12). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo, indican que las cepas de *B. melitensis* aisladas a partir de las cabras seleccionadas, muestran resistencia a los inhibidores de crecimiento contenidos en la formulación del medio de Farrell por lo que la recuperación de cepas fue mayor que con el obtenido con TSA, ya que el crecimiento de contaminantes, inhibió en forma negativa el desarrollo de *Brucella* spp ( $p < 0.05$ ) como se aprecia en la Fig. 2.

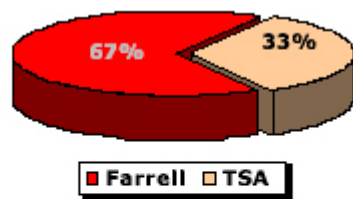
Si bien es cierto que a partir de ambos medios de cultivo y a partir de la grasa de la leche, fue posible aislar *B. melitensis* biovar - 1, el 57% de los aislamientos se realizó a través del medio de Farrell y 43% en el de TSA ( $p < 0.05$ ) como se puede observar en la Figura 3.



**FIGURA 3.** Aislamiento de *B. melitensis* biovar - 1 en medios de cultivos de Farrell y TSA a partir de grasa./ *B. melitensis* biovar - 1 isolation from fat using Farrell and TSA culture media.

Estos datos demuestran que *B. melitensis* biovar-1 puede ser aislada con relativa facilidad a partir de la grasa de la leche en ambos medios utilizados, lo que coincide con varios trabajos que señalan que de la leche colectada, la grasa es la porción más recomendable para realizar el diagnóstico bacteriológico (21), ya que en las hembras de bovino, ovino y caprino infectadas, alrededor del 80% de los animales tienen los nódulos linfáticos supramamarios infectados (22,23). Asimismo, debido a que las bacterias del género *Brucella* son hidrofóbicas como consecuencia de los componentes estructurales de la pared celular, tienden a combinarse con mucho mayor facilidad con la grasa de los tejidos y fluidos animales (11), la leche y en particular la grasa de esta, es quizás después de las descargas vaginales de los animales que recién abortaron, la fuente más probable de contaminación (1), situación que se encuentra demostrada con los resultados obtenidos en este trabajo.

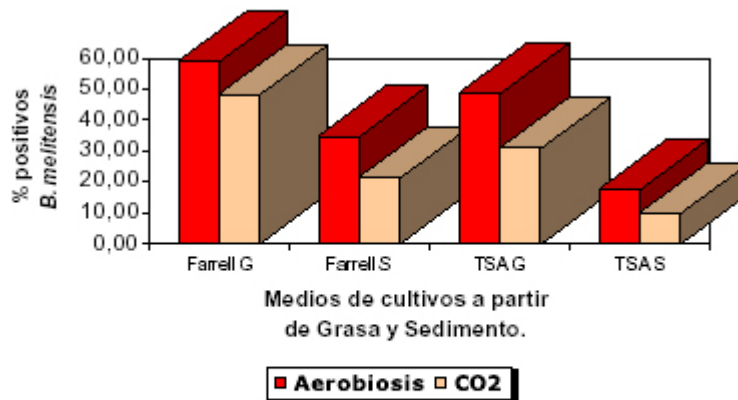
Aunque a partir del sedimento de la leche procesada, se obtuvo una menor proporción de aislamiento de bacterias, el 67% de los aislamientos se obtuvieron mediante la utilización del medio de Farrell y 33% a partir del de TSA ( $p < 0.05$ ) como se expresa en la Figura 4.



**FIGURA 4.** Aislamiento de *B. melitensis* biovar – 1 en medios de Farrell y TSA a partir de sedimento. / *B. melitensis* biovar – 1 isolation from sediment in Farrell and TSA culture media.

Según algunos autores (12, 21, 24), las muestras de leche pueden sembrarse directamente en el medio de cultivo; sin embargo, la sensibilidad aumenta si la leche es centrifugada, y se siembra la grasa y el sedimento por separado. En este sentido, como se observa en la Fig. 4, *B. melitensis* biovar - 1, sí se elimina por la leche de las cabras de Tenex-tepec y puede recuperarse a través de ambos medios de cultivo; no obstante, la centrifugación permite la disociación de ambas fases que componen la leche y las bacterias contaminantes hidrofílicas se asocian al sedimento, por lo que al ser sembradas en medios de cultivo como el TSA enriquecido con suero, favorecen su desarrollo e implica menor crecimiento de *Brucella* spp.

*B. melitensis* biovar 1 mostró un mejor y mayor desarrollo al ser incubada en atmósfera de aerobiosis que bajo presión de bióxido de carbono al 10%, tanto en medio de Farrell como en el de TSA; aunque, ya sea a partir de grasa o sedimento, el mayor número de aislamientos se obtuvo con el medio de cultivo de Farrell y el menor, con el de TSA ( $p < 0.05$ ) como puede ser visto en la Figura 5.



**FIGURA 5.** Aislamiento de *B. melitensis* biovar 1 en medios Farrell y TSA en atmósfera de aerobiosis y CO<sub>2</sub>. / *B. melitensis* biovar – 1 isolation in Farrell and TSA cultura media using air and CO<sub>2</sub> atmosphere.

Debido a las propiedades bioquímicas del género *Brucella*, se esperaba que el número mayor de aislamientos de *B. melitensis*, se obtuviera en la atmósfera de aerobiosis, ya que la mayoría de las especies de *Brucella* y en particular, la que se recuperó en este trabajo, tienen un requerimiento atmosférico de tipo aeróbico (26). No obstante, es importante mencionar que el bióxido de carbono en el metabolismo de *Brucella*, es utilizado en la construcción de las proteínas de la bacteria y, para usos prácticos una atmósfera que contiene 10% de CO<sub>2</sub> puede ser más adecuada para el aislamiento de *Brucella* spp. (11), ya que eso

favorece su crecimiento, lo cual es mejorado en presencia de medios de cultivo adecuados como el de Farrell, en independencia del origen de la muestra (3,14); sin embargo, esas observaciones encontradas en la literatura señalada, no coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo. Se concluye que el medio de Farrell fue más eficaz que el de TSA para ese fin, tanto a partir de la grasa de la leche como del sedimento; igualmente, la incubación de las muestras en atmósfera de aerobiosis resultó en un mejor y más exitoso desarrollo de las bacterias.

## REFERENCIAS

1. Acha PN, Szyfres B. Bacteriosis y micosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington D.C., OPS-OMS, 2001.
2. Ruiz CM. Brucelosis. 3ª Edición. Editorial La prensa Médica Mexicana, S.A., 1986.
3. Martínez OL, Pérez De la Rosa R, Díaz Aparicio E, Snyderlaar AC, Hernández Andrade L, Suárez Güemes F. Estudio de la eliminación en la leche de la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis* en cabras vacunadas con dosis reducida. *Tec Pec Mex*. 2005;43(3): 399-404.
4. Álvarez PE. Situación de la Brucelosis en América. *Panorama General. Memorias del Tercer Foro Nacional de Brucelosis*. Acapulco, Guerrero, México. 1998; 23-31.
5. Norma Oficial Mexicana - 041 - ZOO - 1995: Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. *Diario Oficial de la Federación*. 6 de Noviembre de 1997.
6. Ilhan Z, Solmaz H, Aksakal A, Gulhan T, Ekin IH, Boynukara B. Detection of *Brucella melitensis*. DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. *Arch Med Vet*. 2008;40(2):141-6.
7. Díaz AE, Hernández AL, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. Toluca, México, pp: 1-2,28-33. 2001.
8. Martínez DI, Abeledo MA, Rodríguez MA, Jácome JA, Rivera EL, Vallecillo AJ, et al. Prevalencia de Brucelosis Caprina y su Relación con la Humana en Tenex-tepec, Municipio de Perote, Veracruz, México. *Rev Salud Anim*. 2001;23(3):160-4.
9. Kupluluand O, Sarimehmetoglu B. Isolation and identification of *Brucella* spp in ice cream. *Food Control*. 2004;15(7):511-4.
10. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marín C, Albert D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Res*. 2006;62(1-2):63-70.
11. Carter GR, Wise DJ. *Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology*. Iowa State Press, 6th ed., EUA. 2004.
12. Díaz AE. Pruebas de Diagnóstico en Población Animal. *Memorias del Tercer Foro Nacional de Brucelosis*. 1998, Acapulco, Guerrero, México, pp: 63-77.
13. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*, AVC Inc., University of Prince Edward Island, Prince Edward Island, Canada. 2003.
14. Alton GG, Jones ML, Pietz DE. *Laboratory Techniques in brucellosis*, 2nd ed, Ser No 55, Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1975; 1-163.
15. Navarro Fierro R. *Introducción a la Bioestadística. Análisis de Variables Binarias*. Mc. Graw- Hill, México. 1988.
16. Smith RD. *Veterinary Clinical Epidemiology*. Third Edition, CRC Press, Taylor and Francis Group, 2006. Boca Raton, Florida, USA. 259 pp.
17. Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology*. Third Edition, 2005. Blackwell Science, Ames, Iowa, EUA.

18. World Organization for Animal Health. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 2.7.2. Caprine and ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). OIE Technical Report Series, 5th edition. Paris. 2007.
19. Elfaki MG, Al-Hokail A, Nakeeb ShM, Al-Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. *Med Sci Monit.* 2005; 11(11): MT69-74.
20. Rivers RE, Andrews A, Gonzalez-Smith, G, Donoso A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch Med Vet.* 2006;38: 7-18.
21. Hernández MI, Peña FG, Betancourt M.X. Brucelosis. Manual de Procedimientos de Laboratorio, INDRE/SAGAR, 1996, México, D.F. 1998.
22. Bautista R, Martínez DI, Abeledo MA, Moreno LA, Marín JC, Rodríguez MA, et al. Evaluación histológica de linfonódulos en cabras vacunadas con cepa RB51 de *Brucella abortus*. *Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano.* INIFAP, CP, ITA No. 18, ITMAR No. 1, UACH, UV. Libro Científico No. 1, México, 2004, pp: 405-9.
23. Bautista R, Martínez DI, Abeledo MA, López A, Molina B, Alpírez MM. Persistencia de *Brucella abortus* cepa RB51 en nódulos linfoides de cabras vacunadas a diferentes intervalos de tiempo. *Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano.* INIFAP, CP, ITA No. 18, ITMAR No. 1, UACH, UV. Libro Científico No. 1, México, 2004, pp: 399-403.
24. Martínez DI, Abeledo MA, Rodríguez MA, Bautista R, Rivera EL, Vallecillo AJ, et al. Aislamiento de *Brucella melitensis* biovar - 1 en leche de cabras de la comunidad de Tenex-tepec, Municipio de Perote, Veracruz. *Rev Salud Anim.* 2001;23(2): 123-7.
25. Martínez DI, Abeledo MA, Moreno A, Luna E, Rodríguez MA, Villagómez AS, et al. Determinación de *Brucella melitensis* cepa Rev-1 a partir de leche de cabras vacunadas de Tenex-tepec, Mpio. de Perote, Ver. México. *Rev Salud Anim.* 2002;24(3):92-8.
26. López A, Santiago R, Ocampo D, Monroy I, Domínguez H. Brucelosis, Avances y Perspectivas, Publicación Técnica INDRE, SSA, México, DF. 1991.